

10/518303

17 DEC 2004

Mod. C.E. - 14-7

MODULARIO  
LCA - 107



REC'D 07 AUG 2003

WIPO PCT

# Ministero delle Attività Produttive

## Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

### Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

### Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

N. MI2002 A 001346

Invenzione Industriale



Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

PCT/IB03/2339

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

roma, il .....

20 LUG 2003

per IL DIRIGENTE

Paola Giuliano

Donna Paola Giuliano

## AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO

## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **ORESTE Pasqua**Residenza **MILANO MI**codice **RSTPQN55H47E14B**

PE

2) Denominazione **ZOPPETTI Giorgio**Residenza **MILANO MI**codice **ZPPGRR56R23F963G**

PE

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **SANTORO Tiziana (537 BM) ed altri**

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza **MARIETTI, GISLON e TRUPIANO S.r.l.**via **Larga**n. **16**città **MILANO**cap **20122**(prov) **MI**

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n. **1111**

città

cap

(prov)

## D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl)

gruppo/sottogruppo

**POLISACCARIDI A BASSO PESO MOLECOLARE E PROCEDIMENTO PER LA LORO  
PREPARAZIONE**ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:  SI  NO

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **ORESTE Pasqua**

3)

2) **ZOPPETTI Giorgio**

4)

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data **10/03/2002** N° Protocollo **1000000000**

1)

1

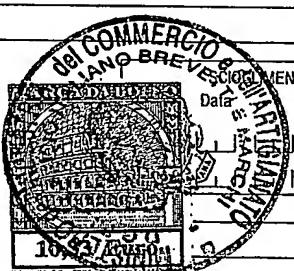
1/1/1/1

2)

1

1/1/1/1

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione



## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

**I Titolari partecipano ai diritti sul brevetto nella misura del 50% ciascuno**

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1)  PROV n. pag. **26**

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) ....

Doc. 2)  PROV n. tav. 

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) ....

Doc. 3)  RIS

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale ....

Doc. 4)  RIS

designazione inventore ....

Doc. 5)  RIS

documenti di priorità con traduzione in italiano ....

Doc. 6)  RIS

autorizzazione o atto di cessione ....

Doc. 7) 

nominativo completo del richiedente ....

8) attestati di versamento, totale Euro **1 DUECENTONOVANTUNO/80**

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data **10/03/2002** N° Protocollo **1000000000**COMPILATO IL **17/06/2002**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

**Dr. T. Santord (No. Iscr. 537)**

obbligatorio

CONTINUA SI/NO  **NO**DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO  **SI**CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI **MILANO****MILANO**codice **1515**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA **MT2002A 001346**

Reg. A.

L'anno **DUE MILA DUE**Il giorno **10** dell'anno **2002** dell'anno **2002**del mese di **GIUGNO**

Il(I) richiedente(I) sopraindicato(I) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda per la concessione di un brevetto per l'invenzione sopraindicata e desidero di concedere la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE



IL DEPOSITANTE

**T. Santord**

L'UFFICIALE ROGANTE

**M. CORTONESI**

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA MI2002A00146

REG. A

DATA DI DEPOSITO 26/03/2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

## D. TITOLO

**POLISACCARIDI A BASSO PESO MOLECOLARE E PROCEDIMENTO PER LA LORO  
PREPARAZIONE**

## L. RIASSUNTO

Si descrivono nuovi K5 polisaccaridi a basso peso molecolare, N-deacetilati, N-solfati e C5 epimerizzati, con un contenuto di acido iduronico pari al 40-60% del totale degli acidi uronici. Questi prodotti sono preparati mediante (i) una epimerizzazione del K5-N-solfato con C5-epimerasi ricombinante isolata e purificata, immobilizzata su un supporto solido a pH di circa 7, a una temperatura di circa 30°C per un periodo di tempo di 12-24 ore e (ii) una depolimerizzazione nitrosa del prodotto epimerizzato; eventualmente seguita da una riduzione con boroidruro di sodio. I passaggi (i) e (ii) possono essere condotti in ordine inverso, sottponendo il K5-N-solfato a depolimerizzazione nitrosa eventualmente seguita da riduzione con boroidruro di sodio e, successivamente, sottponendo il prodotto depolimerizzato a epimerizzazione nelle suddette condizioni.

## M. DISEGNO



Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

**"POLISACCARIDI A BASSO PESO MOLECOLARE E PROCEDIMENTO PER LA  
LORO PREPARAZIONE"**

Titolari: ORESTE, Pasqua; ZOPPETTI, Giorgio; residenti in Milano

Inventori: ORESTE, Pasqua; ZOPPETTI, Giorgio

**MI 2002 A 001346**

**OGGETTO DELL'INVENZIONE**

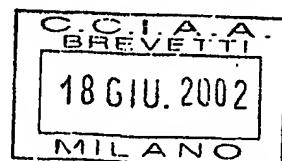
La presente invenzione concerne nuovi polisaccaridi a basso peso molecolare derivati dal polisaccaride K5. Più particolarmente, l'invenzione si riferisce a derivati del polisaccaride K5 ottenibili a partire dal K5 mediante N-deacetilazione, N-solfatazione dell'ammina libera, epimerizzazione di circa il 50% delle unità glucuroniche a unità iduroniche e depolimerizzazione, a un procedimento per la loro preparazione e a nuovi intermedi.

**CONTESTO DELL'INVENZIONE**

I glicosaminoglicani come eparina, eparan solfato, dermatan solfato, condroitin solfato e acido ialuronico sono biopolimeri estratti industrialmente da vari organi animali.

In particolare, l'eparina, principalmente ottenuta mediante estrazione da mucosa intestinale di maiale o da polmone bovino, è un copolimero polidisperso con una distribuzione di peso molecolare da circa 3.000 a circa 30.000 D formato da una miscela di catene essenzialmente costituite da un acido uronico (acido glucuronico o acido iduronico) e da un aminozucchero (glucosamina) uniti da legami  $\alpha$ -1 $\rightarrow$  4 o  $\beta$ -1 $\rightarrow$  4. Nell'eparina, l'unità uronica può essere O-solfatata in posizione 2 e l'unità glucosaminica è N-acetilata o N-solfatata, 6-O-solfatata e 3-O-solfatata in circa lo 0,5% delle unità glucosaminiche presenti.

Le proprietà e la naturale biosintesi dell'eparina nei mammiferi sono state



descritte da Lindahl e al., 1986 in Lane, D. e Lindahl, U. (Editori) "Heparin. Chemical and Biological Properties; Clinical Applications", Edward Arnold, London, Pagine 159-190, da Lindahl, U, Feingold D. S. e Rodén L, 1986 TIBS, 11, 221-225 e da Conrad H. E. "Heparin Binding Proteins", Capitolo 2: Structure of Heparinoids. Academic Press, 1998. La biosintesi dell'eparina avviene a partire dal suo precursore N-acetil-eparosano costituito da una miscela di catene formate dall'unità disaccaridica ripetitiva glucoronil- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetylglucosamina. Detto precursore subisce modificazioni enzimatiche che idrolizzano parzialmente il gruppo N-acetile, sostituendolo con un gruppo  $\text{SO}_3^-$ , epimerizzano il carbossile in posizione 5 di una parte delle unità glucuroniche trasformandole in unità iduroniche e introducendo gruppi O-solfati per arrivare a un prodotto che, una volta estratto industrialmente, ha un numero di gruppi solfati circa doppio del numero di carbossili per unità disaccaridica. Queste modificazioni enzimatiche conducono, fra l'altro, alla formazione della regione pentasaccaridica di legame all'antitrombina III (ATIII), chiamata pentasaccaride attivo, che è la struttura necessaria per l'elevato legame di affinità dell'eparina all'ATIII e fondamentale per l'attività anticoagulante e antitrombotica dell'eparina stessa. Questo pentasaccaride, presente all'interno di solo alcune delle catene che formano l'eparina, contiene un'unità glucosaminica solfatata in posizione 3 e un acido glucuronico intervallato tra disaccaridi contenenti acidi iduronici.

In natura, la formazione del pentasaccaride attivo è resa possibile dalla reazione di epimerizzazione del carbossile di una parte delle unità glucuroniche in unità iduroniche ad opera della D-glucoronil C5-epimerasi (C5-epimerizzazione) e da un'opportuna solfatazione che porta anche all'introduzione di un gruppo solfato sull'ossidrile in posizione 3 della glucosamina. Più particolarmente, in natura la formazione del pentasaccaride attivo è resa possibile dal fatto che la C5-

*Santoro*

epimerizzazione avviene a grappolo ("cluster" in inglese), vale a dire su porzioni di catene, e in modo estensivo che conduce a un prodotto che contiene più unità iduroniche che glucuroniche. L'eparina commerciale contiene infatti circa il 70% di unità iduroniche e il 30% di unità glucuroniche.

Accanto alle attività principali anticoagulante e antitrombotica, l'eparina esercita anche attività antilipemica, antiproliferativa, antivirale, antitumorale e antimetastatica, ma il suo uso come farmaco per queste indicazioni è ostacolato dagli effetti secondari dovuti all'azione anticoagulante che può provocare emorragie.

#### STATO DELLA TECNICA

E' noto che il polisaccaride capsulare K5 isolato da *Escherichia coli*, descritto da Vann W. F. et.al., in European Journal of Biochemistry, 1981, 116, 359-364 ("Vann 1981"), è costituito da una miscela di catene formate dall'unità disaccaridica ripetitiva glucoronil- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetil glucosamina e mostra dunque la stessa sequenza dell'N-acetil-eparosano precursore dell'eparina. Il polisaccaride capsulare K5, indicato qui di seguito "polisaccaride K5" o più semplicemente "K5", è stato modificato per via chimica da Lormeau et al. come descritto in US 5,550,116 e da Casu et al. come descritto in Carbohydrate Research, 1994, 263, 271-284. K5-O-solfati aventi attività antitumorale, antimetastatica, antivirale, in particolare anti-HIV sono descritti in EP 333243 e WO 98/34958. Il K5 è stato anche modificato per via chimica e enzimatica al fine di ottenere prodotti aventi un'attività biologica in vitro sulla coagulazione dello stesso tipo di quella dell'eparina così come estratta da organi animali (eparina estrattiva).

L'ottenimento dei prodotti aventi un'attività sulla coagulazione dello stesso tipo di quella dell'eparina estrattiva avviene mediante procedimenti che mimano quello che avviene in natura e prevedono tutti il passaggio chiave di C5-epimerizzazione con D-



glucuronil C5 epimerasi.

I procedimenti descritti in IT 1230785, WO 92/17507, WO 96/14425 e WO 97/43317 utilizzano il K5 come materiale di partenza. Il K5 proveniente da fermentazione è sottoposto a una N-deacetilazione seguita da N-solfatazione e sul K5-N-solfato così ottenuto è effettuata una C5-epimerizzazione con C5-epimerasi in soluzione, ottenuta o per cromatografia di una soluzione di enzimi microsomiali da mastocitoma di topo (IT 1230785) oppure da fegato bovino (WO 92/17507, WO 96/14425 e WO 97/43317).

La D-glucoronil C5 epimerasi da fegato bovino è stata purificata da Campbell, P. et al. in J. Biol. Chem., 1994, 269/43, 26953-26958 ("Campbell 1994") che hanno anche fornito la sua composizione in aminoacidi e descritto il suo uso in soluzione per la trasformazione di un K5-N- solfato nel corrispondente prodotto epimerizzato al 30%, dimostrando la formazione di acido iduronico mediante metodo HPLC seguente ad una depolimerizzazione nitrosa totale fino a disaccaride.

Il documento WO 98/48006 descrive la sequenza del DNA che codifica la D-glucoronil C5 epimerasi e una D-glucuronil C5 epimerasi ricombinante, ottenuta da un vettore di espressione ricombinante contenente detto DNA, successivamente purificata da Campbell et al. come illustrato da Jin-Ping L. et al. in J. Biol. Chem. 2001, 276, 20069-20077 ("Jin-Ping 2001").

La sequenza completa della C5-epimerasi è stata descritta da Crawford B. E. et al. in J. Biol. Chem., 2001, 276(24), 21538-21543 (Crawford 2001)

Il documento WO 01/72848 descrive un metodo per la preparazione di derivati N-deacetilati N-solfati del polisaccaride K5, epimerizzati almeno al 40% di acido iduronico rispetto al totale degli acidi uronici, aventi un peso molecolare da 2.000 a 30.000, contenenti dal 25 al 50% di catene ad alta affinità per l'ATIII e aventi

un'attività anticoagulante e antitrombotica espressa come rapporto HCII/antiXa da 1,5 a 4.

Detto procedimento, che comprende in sequenza la preparazione del K5 da *Escherichia coli*, N-deacetilazione e N-solfatazione, C5 epimerizzazione, supersolfatazione, selettiva O-desolfatazione, selettiva 6-O-solfatazione e N-solfatazione, prevede che la C5 epimerizzazione sia condotta con C5 epimerasi, in soluzione o immobilizzata, in presenza di cationi bivalenti specifici. Secondo il documento WO 01/72848, la C5 epimerizzazione può essere condotta indifferentemente con un enzima naturale o ricombinante, immobilizzato o in soluzione, a una temperatura da 30 a 40°C per un periodo di tempo da 1 a 24 ore.

Inoltre, detto documento descrive una reazione di depolimerizzazione con acido nitroso eseguita sul prodotto ottenuto al termine della sequenza di reazioni sopra menzionata.

#### SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Nel preparare derivati N-deacetilati N,O-solfati del polisaccaride K5, epimerizzati almeno al 40% di acido iduronico rispetto al totale degli acidi uronici e aventi basso peso molecolare secondo il metodo descritto in WO 01/72848, è stato constatato che la depolimerizzazione del prodotto ad alto peso molecolare ottenuto alla fine del passaggio (g) del procedimento può dare risultati non uniformi in quanto si ottengono in generale dei prodotti depolimerizzati aventi un'attività su tutti i parametri della coagulazione molto inferiore a quella dei prodotti ad alto peso molecolare da cui derivano. Questo avviene perché la degradazione con acido nitroso viene influenzata dalla presenza dei gruppi sulfati. In particolare i sulfati in posizione 3 della glucosamina portano a prodotti disomogenei, come descritto da Nagasawa et al. in Thrombosis Research, 1992, 65, 463-467 (Nagasawa 1992).



E' stato ora trovato che LMW-epiK5-N-solfati in cui il contenuto di acido iduronico rispetto al totale di acidi uronici è del 40-60%, preferibilmente intorno al 50% costituiscono nuovi validi intermedi per la preparazione di LMW-epiK5-N,O sulfati aventi un elevato grado di attività su diversi parametri biologici, in particolare su parametri della coagulazione.

Questi LMW-epiK5-N-solfati vengono ottenuti a partire da un K5-N-solfato con una reazione di epimerizzazione con una C5-epimerasi ricombinante isolata e purificata, immobilizzata su un supporto solido, a una temperatura di circa 30°C e a un pH di circa 7 per 12-24 ore in presenza di un catione bivalente scelto tra calcio, magnesio, bario e manganese e a una successiva reazione di depolimerizzazione nitrosa del prodotto epimerizzato così ottenuto, o viceversa.

Sorprendentemente, da osservazioni effettuate sull'andamento della reazione di epimerizzazione nelle condizioni suddette, è possibile ipotizzare che, contrariamente a quanto avviene in natura nella biosintesi dell'eparina, si verifichi una C5-epimerizzazione del substrato non a "cluster" ma in modo regolare ogni 2 unità di acido glucuronico, dando luogo a epi-K5-N-solfato-derivati caratterizzati da un'unità tetrasaccaridica ripetitiva costituita da due unità glucosaminiche distanziate da un'unità glucuronica e seguite da un'unità iduronica o viceversa.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Nella presente descrizione si useranno termini o espressioni convenzionali al fine di uniformare la terminologia e rendere il testo più comprensibile. In particolare:

- con "K5" o "polisaccaride K5" si intende il polisaccaride capsulare da *Escherichia coli* ottenuto per fermentazione vale a dire una miscela di catene costituite da unità disaccaridiche di acido glucuronico-N-acetylglucosamina ripetitive eventualmente contenenti un doppio legame

all'estremità non riducente come sopra illustrato, comunque preparato e purificato secondo i metodi descritti in letteratura, in particolare secondo Vann 1981, secondo Manzoni M. et al., Journal of Bioactive Compatible Polymers, 1996, 11, 301-311 ("Manzoni 1996"), secondo il metodo descritto in WO 01/72848 o come descritto nella PREPARAZIONE I qui di seguito;

- con "C5-epimerasi" si intende la D-glucoronil C-5 epimerasi, estrattiva o ricombinante, comunque preparata, isolata e purificata, in particolare come descritto in Campbell 1994, in WO 98/48006, in Jin-Ping L. et al. in J. Biol Chem. 2001, 276, 20069-20077 (Jin-Ping 2001") o in Crawford 2001;
- con "K5-amina" si intende il K5 N-deacetilato per almeno il 95%;
- con "K5-N-solfato" si intende il K5 N-deacetilato e N-solfato per almeno 95%, come descritto qui di seguito;
- con "epiK5-N-solfato" si intende il K5-N-solfato in cui il 40-60% delle unità glucuroniche è C5-epimerizzato a unità iduroniche, come descritto qui di seguito;
- con "epiK5-N,O-solfato" si intende un K5-N,O-solfato in cui il 40-60% delle unità glucuroniche è C5-epimerizzato a unità iduroniche, del tipo di quelli descritti in WO 01/72848.

Inoltre:

- i termini e espressioni convenzionali qui sopra definiti si riferiscono a K5 così come isolati dopo fermentazione, generalmente con una distribuzione di pesi molecolari da circa 1.500 a circa 50.000 con un peso molecolare medio di 10.000- 25.000, vantaggiosamente di 15.000-

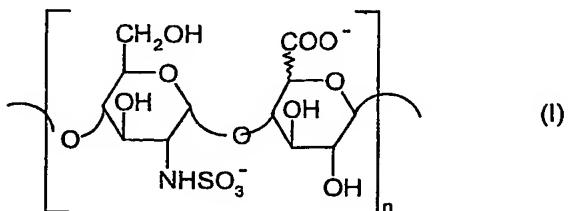


25.000;

- i termini e espressioni convenzionali qui sopra definiti, quando preceduti dall'acronimo "LMW" (dall'inglese "low molecular weight", basso peso molecolare), per esempio LMW-K5-N-solfato, LMW-epiK5-N-solfato designano prodotti a basso peso molecolare, ottenuti per frazionamento o per depolimerizzazione;
- i termini e espressioni convenzionali come qui sopra definiti, quando sono seguiti da "-derivato" designano globalmente tanto i derivati da K5 nativo che quelli a basso peso molecolare
- salvo specifica, diversa indicazione, con "grado di solfatazione" si intende il rapporto  $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$ , esprimibile anche come numero di gruppi solfato per unità disaccaridica, misurato con il metodo coduttimetrico descritto da Casu B. et al. in Carbohydrate Research, 1975, 39, 168-176 (Casu 1975), lo stesso utilizzato in WO 01/72848;
- con "condizioni di O-supersolfatazione" si intende una O-solfatazione spinta effettuata per esempio secondo il Metodo C descritto da B. Casu et al. in Carbohydrate Research, 1994, 263, 271-284 (Casu 1994);
- con il termine "alchile" si intende un alchile lineare o ramificato, mentre con "tetrabutilammonio" si intende indicare il gruppo ammonio sostituito con quattro gruppi *n*-butile.

Secondo uno dei suoi aspetti, la presente invenzione concerne nuovi polisaccaridi K5 a basso peso molecolare N-deacetilati, N-solfati per almeno il 90% e epimerizzati (LMW-epiK5-N-solfati) aventi un contenuto in acido iduronico del 40-60% rispetto al totale degli acidi uronici e un peso molecolare con una distribuzione da circa 1.000 a circa 10.000 con un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 7.500.

I LMW-epiK5-N-solfati della presente invenzione sono costituiti da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula I



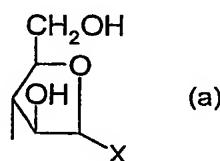
in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 2 a 20 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

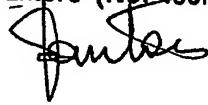
In questo contesto, il termine "chimicamente accettabile" è riferito a un catione utile nelle sintesi chimiche, come gli ioni sodio, ammonio, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)tetraalchilammonio, o per la purificazione del prodotto, mentre "farmaceuticamente accettabile" si spiega da sé.

Cationi vantaggiosi sono quelli derivati da metalli alcalini, metalli alcalino-terrosi, ammonio, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)tetraalchilammonio, alluminio e zinco. Cationi preferiti sono gli ioni sodio, calcio e tetrabutilammonio.

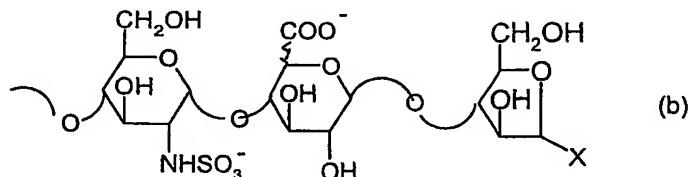
La provenienza dei nuovi epiK5-N-solfati dell'invenzione da un passaggio di depolimerizzazione nitrosa, comporta, all'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene, la presenza di un'unità 2,5-anidromannosio

o, in caso di riduzione con ad esempio sodioboroidruro, di 2,5-anidromannitolo di struttura (a)





in cui X rappresenta un gruppo formile o un gruppo idrossimetile. Di conseguenza, l'estremità riducente della maggioranza (60-70% delle catene) è in realtà rappresentata dalla struttura (b)



in cui X è come sopra definito.

La presenza della struttura (a) non ha alcuna influenza sulle caratteristiche chimiche degli epiK5-N-solfati e dei loro derivati in quanto eventuali solfatazioni comporterebbero un'eventuale introduzione di uno o due gruppi solfati che non sposterebbero comunque il grado di solfatazione dei derivati O-solfatati in modo significativo. Inoltre, la presenza della struttura (a) non influenza l'attività biologica dei prodotti, come dimostrato da Østergaard P. B. et al. in Thrombosis Research, 1987, 45, 739-749 (Østergaard 1987) per le eparine a basso peso molecolare.

Preferibilmente, il nuovo polisaccaride K5 epimerizzato, N-deacetilato, N-solfato è praticamente privo di gruppi acetile, contiene circa 50% di acido iduronico e circa 50% di acido glucuronico e ha una distribuzione di pesi molecolari e un peso molecolare medio come sopra indicati.

Secondo un altro dei suoi aspetti, la presente invenzione fornisce un procedimento per la preparazione di LMW-epiK5-N-solfati come sopra illustrati, caratterizzato dal fatto che si sottopone un K5-N-solfato, in un qualsiasi ordine,

- (i) a una C5-epimerizzazione con una D-glucuronil C5-epimerasi isolata, purificata e immobilizzata su un supporto solido, a un pH di circa 7, a una temperatura di circa 30°C e per un periodo di tempo di 12-24 ore in

*Santoro*

presenza di almeno uno ione bivalente scelto tra calcio, magnesio, bario e manganese; e

- (ii) a una depolimerizzazione nitrosa eventualmente seguita da una riduzione con boroidruro di sodio.

L'espressione "in qualsiasi ordine" indica che il procedimento può essere indifferentemente condotto sia nel senso (i)-(ii), vale a dire nella sequenza sopra indicata, che in senso inverso, vale a dire anche nel senso (ii)-(i), sottponendo il K5-N-solfato dapprima alla reazione di depolimerizzazione nitrosa, eventualmente seguita dalla riduzione con boroidruro di sodio, e successivamente alla C5-epimerizzazione nelle condizioni sudette. L'ordine preferito è nel senso (i)→(ii).

La C5-epimerasi, preferibilmente ricombinante, isolata e purificata per esempio secondo Campbell 1994, WO 98/48006, Jin-Ping 2001 o Crawford 2001, viene immobilizzata su un supporto inerte in presenza del substrato, vale a dire o in presenza del K5-N-solfato di partenza oppure in presenza del LMW-K5-N-solfato. L'immobilizzazione viene effettuata secondo i metodi convenzionali, per esempio come descritto in WO 01/72848.

La reazione di C-5epimerizzazione viene condotta facendo ricircolare 20-1.000 ml di una soluzione di HEPES 25 mM a pH circa 7 contenente 0,001-10 g di substrato (K5-N-solfato o LMW-K5-N-solfato) e un catione scelto tra calcio, magnesio, bario e manganese a una concentrazione tra 10 e 60 mM attraverso una colonna contenente da  $1,2 \times 10^7$  a  $3 \times 10^{11}$  cpm dell'enzima immobilizzato, mantenendo il pH a circa 7 a la temperatura a circa 30°C, a un flusso di 30-220 ml/ora per un periodo di tempo di 12-24 ore, vantaggiosamente di 15-24 ore.

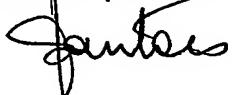
Preferibilmente si fa ricircolare detta soluzione a un flusso di circa 200 ml/ora per tutta una notte (15-20 ore). Il prodotto ottenuto è purificato e separato secondo



metodi noti, per esempio mediante ultrafiltrazione e precipitazione con etanolo. Il prodotto così ottenuto è costituito o da epiK5-N-solfato (e in tal caso viene disiolto in acqua e sottoposto a depolimerizzazione) oppure da LMW-epiK5-N-solfato (e in tal caso costituisce il prodotto finale). La percentuale di epimerizzazione, in pratica la quantità di unità iduroniche rispetto alle glucuroniche, è calcolata con  $^1\text{H}$ -RMN secondo il metodo descritto in WO 96/4425.

La reazione di depolimerizzazione nitrosa è condotta secondo i metodi noti per la depolimerizzazione dell'eparina, per esempio secondo il metodo descritto in EP 37319, in WO 82/03627 oppure secondo il metodo per la depolimerizzazione di un K5-N-solfato descritto in EP 544592, ma a partire da un K5-N-solfato o da un epiK5-N-solfato contenente da 0 a non più del 10% di gruppi acetile. Preferibilmente, la depolimerizzazione, effettuata con nitrito sodico e acido cloridrico, è seguita da una riduzione *in situ* con boroidruro di sodio.

In pratica, una soluzione acquosa fredda del substrato (K5-N-solfato o epiK5-N-solfato) viene portata a pH acido (circa 2) con acido cloridrico e, sempre a freddo, trattata con nitrito sodico mantenendo la temperatura (circa 4°C) e il pH (circa 2) costanti e, al termine della depolimerizzazione (circa 15 - 30 minuti) la soluzione viene neutralizzata con idrossido di sodio e trattata, sempre a circa 4°C con una soluzione acquosa di boroidruro di sodio. Al termine della riduzione (circa 4 ore) l'eccesso di boroidruro di sodio è distrutto con acido cloridrico, la soluzione è neutralizzata con idrossido di sodio e il prodotto depolimerizzato, contenente la struttura (a) in cui X è idrossimetile nella maggioranza delle sue catene, viene isolato secondo metodi noti, per esempio per semplice precipitazione con etanolo o acetone. Il prodotto ottenuto al termine della depolimerizzazione può essere o un LMW-epiK5-N-solfato (in tal caso costituisce il prodotto finale) oppure un LMW-K5-N-solfato (e in



tal caso viene direttamente sottoposto a C5-epimerizzazione come illustrato qui sopra, dopo isolamento o anche in soluzione senza essere preventivamente isolato).

Controllando opportunamente la reazione di depolimerizzazione, in particolare utilizzando diverse quantità di nitrito sodico/acido cloridrico, si ottengono LMW-K5-N-solfati o LMW-epiK5-N-solfati aventi un peso molecolare medio in tutto l'intervallo da circa 1.500 a circa 7.500, calcolato allo spettro  $^{13}\text{C}$ -RMN attraverso l'integrazione del segnale attribuito al C-2 del 2,5-anidromannitolo con quella del carbonio anomerico della glucosamina interna alla catena polisaccaridica.

Il LMW-K5-N-solfato, contenente al massimo 10%, preferibilmente da 0 a non più del 5% di gruppi acetile, è un nuovo intermedio nel processo illustrato qui sopra.

Così, secondo un altro dei suoi aspetti, la presente invenzione fornisce un nuovo polisaccaride K5 N-deacetilato, N-solfato per almeno il 90% costituito da miscele di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha un peso molecolare con una distribuzione da circa 1.000 a circa 10.000 con un peso molecolare medio da circa 1.000 a circa 7.500 o un suo sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

Detto polisaccaride contiene preferibilmente da 0 a non più di 5% di gruppi acetile. Esso contiene anche un'unità di struttura (a) come sopra definita all'estremità riducente della maggior parte delle catene che lo costituiscono.

I nuovi LMW-epiK5-N-solfati ottenuti al termine del procedimento della presente invenzione sono usualmente isolati sotto forma del loro sale di sodio. Detto sale di sodio può essere convertito in un altro sale. Detto altro sale può essere quello di un altro metallo alcalino, di un metallo alcalino terroso, di ammonio, di  $(\text{C}_1\text{-}\text{C}_4)$ tetraalchilammonio, di alluminio o di zinco. Sali preferiti sono quelli di sodio, di calcio e di tetrabutilammonio.

Il K5-N-solfato impiegato come materiale di partenza è ben noto in letteratura ed



è descritto nei documenti citati qui sopra per illustrare lo stato della tecnica. Il suddetto materiale di partenza è invariabilmente ottenuto per N-deacetilazione del K5 e successiva N-solfatazione della K5-ammina così ottenuta.

Tuttavia, è stato constatato che la preparazione di un K5-N-solfato praticamente privo di gruppi acetile o NH<sub>2</sub> viene facilitata se il K5 da cui esso viene preparato è particolarmente puro, in particolare se esso non contiene sostanze lipofile. Inoltre, è stato constatato che un K5-N-solfato preparato da un K5 privo di sostanze lipofile viene più facilmente O-supersolfatato (come descritto nella domanda pendente IT MI2001A00397).

E' dunque preferibile, secondo la presente invenzione, utilizzare un K5-N-solfato di partenza preparato da un K5 purificato come descritto nella PREPARAZIONE II qui di seguito. Detto K5-N-solfato, il cui spettro <sup>13</sup>C-RMN non mostra tracce di gruppi N-acetili o NH<sub>2</sub> è descritto nella PREPARAZIONE III qui di seguito

I nuovi LMW-epiK5-N-solfati della presente invenzione sono utili intermedi per la preparazione di LMW-epiK5-N,O-solfati ad attività anticoagulante e antitrombotica. In particolare, questi nuovi prodotti possono essere sottoposti a O-supersolfatazione, O-desolfatazione selettiva, 6-O-solfatazione e N-solfatazione per ottenere i suddetti LMW-epiK5-N,O-solfati puri in modo riproducibile e sicuro.

A differenza di altri epiK5-N-solfati, ad esempio come indicato in WO 92/17507, i nuovi LMW-epiK5-N-solfati della presente invenzione sono privi di attività anticoagulante e posseggono una interessante attività contro i radicali liberi. Grazie alla loro scarsa tossicità, i nuovi LMW-epiK5-N-solfati sono principi attivi per la preparazione di composizioni farmaceutiche utilizzabili come coadiuvanti nel trattamento della cardiopatia ischemica e per il trattamento di dermatiti da radiazioni o

*Santoro*

di composizioni cosmetiche utili come anti-invecchiamento della pelle.

Così, secondo un suo aspetto ulteriore, la presente invenzione fornisce composizioni farmaceutiche contenenti, in qualità di un loro principio attivo, una quantità farmacologicamente attiva di un epiK5-N-solfato come sopra illustrato o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in miscela con un eccipiente farmaceutico.

Nelle composizioni farmaceutiche della presente invenzione per la somministrazione orale, sottocutanea, endovenosa, transdermica o topica, i principi attivi sono preferibilmente somministrati sotto forma di unità di dosaggio, in miscela con i classici eccipienti o veicoli farmaceutici.

La posologia può variare ampiamente in funzione dell'età, del peso, e delle condizioni di salute del paziente. Questa posologia comprende la somministrazione di una dose da 1 a 1000 mg, vantaggiosamente da 10 a 750 mg, preferibilmente 250 a 500 mg da una a tre volte al giorno per via endovenosa, sottocutanea, orale, transdermica o topica.

Secondo un altro dei suoi aspetti, la presente invenzione fornisce anche una composizione cosmetica contenente, come un suo principio attivo, una quantità efficace di un epiK5-N-solfatato o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in miscela con un eccipiente cosmetico.

Un sale scelto nel gruppo consistente nei sali di sodio, potassio, calcio, magnesio, alluminio e zinco costituisce valido principio attivo delle composizioni della presente invenzione.

Infine, secondo un suo ulteriore aspetto, la presente invenzione concerne l'uso della C5-epimerasi, preferibilmente ricombinante, isolata, purificata e immobilizzata su supporto inerte, per la conversione di un K5-N-solfato-derivato in un corrispondente epiK5-N-solfato-derivato caratterizzato da un'unità tetrasaccaridica ripetitiva costituita

*Santoro*

da due unità glucosaminiche distanziate da un'unità glucuronica e seguite da un'unità iduronica oppure distanziate da un'unità iduronica e seguite da un'unità glucuronica.

Detta conversione avviene secondo il metodo sopra descritto.

I seguenti esempi illustrano l'invenzione.

#### PREPARAZIONE I

##### *Preparazione del polisaccaride K5 da Escherichia coli*

Viene dapprima eseguita una fermentazione in beuta utilizzando il seguente medium:

Farina di soia degrassata	2	g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,7	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	g/l
MgCl <sub>2</sub>	0,11	g/l
Sodio citrato	0,5	g/l
Ammonio solfato	1	g/l
Glucosio	2	g/l
Acqua di fonte	1000	ml

pH = 7,3

Il medium viene sterilizzato a 120°C per 20 minuti. Il glucosio viene preparato separatamente in forma di soluzione che viene sterilizzata a 120°C per 30 minuti e addizionata sterilmente al medium. La beuta viene inoculata con una sospensione di cellule di *E. coli* Bi 8337/41 (O10:K5:H4) proveniente da uno slant tenuto in Triptic soy agar, e incubata a 37°C per 24 ore sotto agitazione controllata (160 rpm, 6 cm di corsa). La crescita batterica si misura contando le cellule con il microscopio. In un'operazione successiva, un fermentatore Chemap-Braun da 14 l contenente lo stesso medium di cui sopra, viene inoculato allo 0,1% con la coltura della beuta di cui sopra e si effettua la

fermentazione mediante aerazione di 1 vvm, (vvm = volume di aria per volume di liquido per minuto) agitazione 400 rpm e temperatura di 37°C per 18 ore. Durante la fermentazione vengono misurati il pH, l'ossigeno, il glucosio residuo, il polisaccaride K5 prodotto e la crescita batterica. Alla fine della fermentazione la temperatura viene portata a 80°C per 10 minuti. Le cellule vengono separate dal medium tramite centrifugazione a 10.000 rpm e il surnatante viene ultrafiltrato usando un modulo SS 316 (MST) equipaggiato con membrane PES con cut-off nominale di 800 e 10.000 D per ridurre il volume a 1/5. Il polisaccaride K5 viene quindi precipitato mediante addizione di 4 volumi di acetone a 4°C e lasciato a sedimentare per una notte a 4°C. Infine viene recuperato mediante centrifugazione a 10.000 rpm per 20 minuti o filtrazione. Si esegue poi la deproteinizzazione del solido ottenuto utilizzando una proteasi di tipo II da *Aspergillus orizae* in tampone di NaCl 0,1 M e EDTA 0,15 M a pH 8 contenente SDS (sodio dodecil solfato) allo 0,5% (10 mg/l di filtrato) a 37°C per 90 minuti. La soluzione ottenuta viene ultrafiltrata su modello SS 316 con membrane a cut-off nominale di 10.000 D con 2 estrazioni con NaCl 1M e lavata con acqua fino a scomparsa dell'assorbanza nell'ultrafiltrato. Il polisaccaride K5 viene quindi precipitato con acetone e si ottiene una resa di 850 mg per litro di fermentatore. La purezza del polisaccaride ottenuto viene misurata tramite la determinazione degli acidi uronici (metodo al carbazolo), NMR al protone e al carbonio 13, UV e contenuto di proteine. La purezza risulta maggiore dell'80%.

Il polisaccaride ottenuto è composto da due frazioni a diverso peso molecolare, rispettivamente 30.000 e 5.000 D come risulta dalla determinazione mediante HPLC impiegando una colonna Pharmacia 75 HR e una frazione singola con un tempo di ritenzione di circa 9 minuti usando due colonne in serie di Bio-sil SEC 250 (Bio Rad) e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> come fase mobile a temperatura ambiente e flusso di 0,5 ml/minuti. La misura



viene effettuata contro una curva standard ottenuta con frazioni di eparina a peso molecolare noto.

Lo spettro  $^1\text{H}$ - RMN del K5 purificato così ottenuto mostra diversi segnali attribuibili a metili di sostanze lipofile.

#### PREPARAZIONE II

##### *Purificazione del K5*

A 100 ml di una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio e termostatata a 4°C viene sciolto 1 g del K5 ottenuto alla fine della PREPARAZIONE I e alla soluzione così ottenuta vengono addizionati 3 volumi di isopropanolo freddo. La concentrazione salina della soluzione viene portata a 3 M mediante aggiunta della quantità calcolata di una soluzione satura di cloruro sodico e si lascia la soluzione ottenuta in ambiente freddo (circa 4°C) per una notte. Il precipitato formatosi viene separato mediante centrifugazione a 10.000 rpm per 20 minuti e la purezza del prodotto viene controllata mediante dialisi per una notte e successivo esame dello spettro  $^1\text{H}$ -RMN, da cui devono essere assenti segnali nella regione sotto 1,5 ppm. Se necessario, l'operazione di dissoluzione in acqua satura di NaCl e precipitazione con isopropanolo viene ripetuta. Il precipitato viene sciolto in acqua e ultrafiltrato su membrana Miniplate Millipore cut off 10.000 D fino a scomparsa dei sali. Si ottiene così un K5 avente una purezza di almeno 99% dal cui spettro  $^1\text{H}$ -RMN non risulta alcuna traccia di impurezze lipofile nella regione sotto 1,5 ppm.

#### PREPARAZIONE III

##### *Preparazione di un K5-N-solfato*

###### *(i) N-Deacetilazione*

Dieci grammi di polisaccaride K5 puro preparato come descritto nella PREPARAZIONE II vengono solubilizzati con 1000 ml di sodio idrossido 2N e la

soluzione così preparata viene lasciata a 60 °C per 24 ore. La soluzione viene portata a temperatura ambiente quindi a pH neutro (pH7) con acido cloridrico 6N.

(ii) *N-solfatazione*

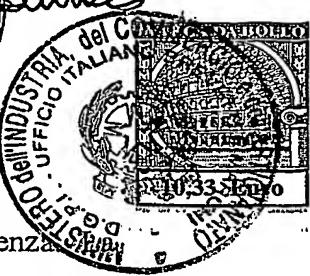
Alla soluzione contenente il K5 deacetilato, mantenuta a 40 °C, vengono aggiunti 16 g di sodio carbonato e successivamente e in 4 ore, 16 g di piridina.solfotriossido. Alla fine della reazione, dopo 24 ore, la soluzione viene portata a temperatura ambiente, poi a pH 7,5-8 con una soluzione al 5% di acido cloridrico. Il prodotto viene purificato dai sali mediante diafiltrazione usando una membrana a spirale avvolta da 1.000 D (prepscale cartridge-Millipore). Il processo viene terminato quando la conducibilità del permeato è inferiore a 1000  $\mu$ S, preferibilmente inferiore a 100  $\mu$ S. L'intradialisi si riduce fino ad ottenere una concentrazione del polisaccaride del 10% usando lo stesso sistema da dialisi in concentrazione. La soluzione concentrata viene essiccata mediante liofilizzazione. All'analisi dello spettro  $^{13}\text{C}$ -RMN non appaiono N-acetili o  $\text{NH}_2$  residui.

#### ESEMPIO 1

a) *epimerizzazione del K5-N-solfato*

2 g di K5 N-solfato ottenuto nella PREPARAZIONE III viene dissolto in 120 ml di tampone HEPES 25 mM, pH 7, contenente  $\text{CaCl}_2$  50 mM. La soluzione ottenuta viene fatta ricircolare attraverso una colonna da 50 ml caricata con la resina contenente l'enzima immobilizzato ottenuto come descritto in WO 96/14425. Questa operazione è condotta a 30°C con un flusso di 200 ml/h per 24 ore. Il prodotto ottenuto viene purificato tramite ultrafiltrazione su membrana da 1000 D e passaggio su colonna a scambio ionico IR 120  $\text{H}^+$ , neutralizzando l'eluato con  $\text{NaOH}$  1N. Il campione viene recuperato per precipitazione con etanolo o acetone.

Si ottiene un prodotto epimerizzato con rapporto acido iduronico/acido



glucuronico di 55/45 contro un rapporto di 0 /100 del prodotto di partenza. Il percentuale di epimerizzazione è stata calcolata con <sup>1</sup>H-RMN secondo il metodo descritto in WO 96/14425. La resa, calcolata misurando il contenuto di acidi uronici contro standard col metodo al carbazolo (Bitter and Muir Anal. Biochem. 39, 88-92-1971) è pari al 90%.

b) *Depolimerizzazione dell'epi-K5-N-solfato*

1 g di prodotto ottenuto nel passaggio (a) viene depolimerizzato mediante il metodo di degradazione con acido nitroso e seguente riduzione dell'aldeide formatasi. In particolare si procede sciogliendo il prodotto in 25 ml di acqua distillata e addizionandolo con 230 mg di sodio nitrito disciolti in 115 ml di acqua distillata. La soluzione viene quindi portata a 4°C e il pH a 2 con HCl 0,1 N e mantenuto per 30 minuti. A fine reazione la soluzione viene portata a temperatura ambiente e il pH a 7 con NaOH 0,1 M. La soluzione viene quindi addizionata con 450 mg. di NaBH<sub>4</sub> e lasciata reagire per 4 ore. Il prodotto viene recuperato tramite precipitazione con 3 volumi di acetone a 4°C, filtrazione con imbuto filtrante e essiccamiento a 40° C in stufa a vuoto. Si ottengono 900 mg di LMW-epiK5-N-solfato con una distribuzione di pesi molecolari misurata con metodo HPLC che va da 1.000 a 4000.

ESEMPIO 2

(a) *Depolimerizzazione del K5-N-solfato*

2 g di K5-N-solfato ottenuto nella PREPARAZIONE III viene depolimerizzato come descritto nell'Esempio 1 (b). In questo caso si utilizzano 100 mg di sodio nitrito e 300 mg di sodio boroidruro. Si ottengono 1,8 g di LMW-K5-N-solfato. con un peso molecolare medio di 5.000

(b) *Epimerizzazione del LMW-K5-N-solfato*

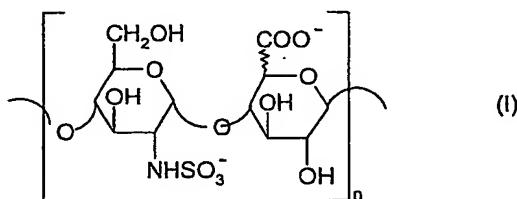
1 g di LMW-K5 N-solfato ottenuto nel passaggio a) viene trattato come descritto

nel passaggio (a) dell'Esempio 1. Si ottiene un prodotto epimerizzato con rapporto acido iduronico/acido glucuronico di 44/56 contro un rapporto di 0/100 del prodotto di partenza, con una distribuzione di pesi molecolari da 2.000 a 10.000 e con un peso molecolare medio di 5.000 D. La resa, calcolata misurando il contenuto di acidi uronici contro standard col metodo al carbazolo (Bitter and Muir Anal. Biochem. 39, 88-92-1971) è pari al 90%.

*Spurio*

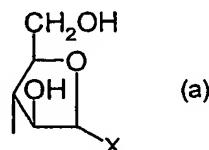
## RIVENDICAZIONI

1. Un polisaccaride K5 N-deacetilato, N-solfato per almeno il 90% e epimerizzato avente un contenuto in acido iduronico del 40-60% rispetto al totale degli acidi uronici e un peso molecolare con una distribuzione da circa 1.000 a circa 10.000 con un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 7.500 o un suo sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile.
2. Il polisaccaride della rivendicazione 1, in cui detto sale è di un metallo alcalino, di un metallo alcalino terroso, di ammonio, di (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)tetraalchilammonio, di alluminio o di zinco.
3. Il polisaccaride della rivendicazione 1 in cui detto sale è quello di sodio, di calcio o di tetrabutilammonio.
4. Il polisaccaride della rivendicazione 1 costituito da una miscela di catene in cui almeno 90% di dette catene ha la formula I



in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60% da acido iduronico e n è un numero intero da 2 a 20 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

5. Il polisaccaride della rivendicazione 4 contenente un'unità di struttura (a)



*Spedite*

in cui X rappresenta un gruppo formile o un gruppo idrossimetile, all'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene.

6. Il polisaccaride della rivendicazione 4 praticamente privo di gruppi acetile, contenente circa 50% di acido iduronico e circa 50% di acido glucuronico.

7. Un polisaccaride secondo una delle rivendicazioni 4-6, in cui detto sale è di un metallo alcalino, di un metallo alcalino terroso, di ammonio, di (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)tetraalchilammonio, di alluminio o di zinco.

8. Un polisaccaride secondo una delle rivendicazioni 4-6, in cui detto sale è quello di sodio, di calcio o di tetrabutilammonio.

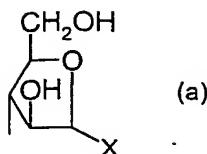
9. Procedimento per la preparazione di un polisaccaride K5 N-deacetilato, N-solfato per almeno il 90% e epimerizzato avente un contenuto in acido iduronico del 40-60% rispetto al totale degli acidi uronici e un peso molecolare con una distribuzione da circa 1.000 a circa 10.000 con un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 7.500 o di un suo sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile, caratterizzato dal fatto che si sottopone un K5-N-solfato, in un qualsiasi ordine,

- (i) a una C5-epimerizzazione con una D-glucuronil C5-epimerasi ricombinante isolata, purificata e immobilizzata su un supporto solido, a una pH di circa 7, a una temperatura di circa 30°C e per un periodo di tempo di 12-24 ore in presenza di almeno uno ione bivalente scelto tra calcio, magnesio, bario e manganese; e
- (ii) a una depolimerizzazione nitrosa eventualmente seguita da una riduzione con boroidruro di sodio;

si isola il prodotto così ottenuto sotto forma di sale di sodio e si trasforma eventualmente detto sale di sodio in un altro sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile.



10. Procedimento secondo la rivendicazione 9 in cui detto altro sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile è un altro sale di metallo alcalino, un sale di metallo alcalino terroso, di ammonio, di (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)tetraalchilammonio, di alluminio o di zinco.
11. Procedimento secondo la rivendicazione 10 in cui detto altro sale è quello di calcio o di tetrabutilammonio.
12. Procedimento secondo la rivendicazione 9 in cui, nel passaggio (i), la C5-epimerizzazione viene condotta facendo ricircolare 20-1.000 ml di una soluzione di HEPES 25 mM a pH circa 7 contenente 0,001-10 g di substrato e un catione scelto tra calcio, magnesio, bario e manganese a una concentrazione tra 10 e 60 mM attraverso una colonna contenente da 1,2 x 10<sup>7</sup> a 3 x 10<sup>11</sup> cpm dell'enzima immobilizzato, mantenendo il pH a circa 7; la temperatura a circa 30°C, a un flusso di 30-220 ml/ora per un periodo di tempo di 12-24 ore.
13. Procedimento secondo la rivendicazione 12 in cui si fa ricircolare detta soluzione a un flusso di circa 200 ml/ora per 15-20 ore.
14. Procedimento secondo la rivendicazione 9 in cui, nel passaggio (ii), la depolimerizzazione è effettuata con nitrito sodico e acido cloridrico ed è seguita da una riduzione *in situ* con boroidruro di sodio.
15. Un polisaccaride K5 N-deacetilato, N-solfato per almeno il 90% costituito da miscele di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha un peso molecolare con una distribuzione da circa 1.000 a circa 10.000 con un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 7.500 o un suo sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile.
16. Il polisaccaride della rivendicazione 15 contenente da 0 a non più di 5% di gruppi acetile.
17. Il polisaccaride della rivendicazione 16 contenente un'unità di struttura (a)



in cui X rappresenta un gruppo formile o un gruppo idrossimetile, all'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene.

18. Una composizione farmaceutica contenente, in qualità di un suo principio attivo, una quantità farmacologicamente attiva di un polisaccaride secondo una delle rivendicazioni da 1 a 11, in miscela con un eccipiente farmaceutico.

19. Una composizione cosmetica contenente, in qualità di un suo principio attivo, un polisaccaride secondo una delle rivendicazioni da 1 a 11, in miscela con un eccipiente cosmetico.

